# บทที่ 2

# วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 1. วัสดุ

### 1.1 จุลินทรีย์

1.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกจะมี 8 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *L. brevis* TISTR 855, *L. casei* TISTR 1304, *L. plantarum* TISTR 050, *Bacillus amyloliquefacien* TISTR 1045, *B. subtilis* TISTR 008, *B. coagulan* TISTR 1456 และ *B. licheniformis* จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.1.2 จุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อ

โดยใช้เชื้อ *Vibrio harveyi* จากศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### 1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1 อาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS) (Merck) สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp.

1.2.2 อาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) (Merck) สำหรับใช้ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ

1.2.3 อาหาร Nutrient Broth (NB) (Merck) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp.

1.2.4 อาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) (Merck) ที่โซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp., *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus*

1.2.5 อาหาร Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) (Merck) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเลี้ยงเชื้อ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus*

### 1.3 สารเคมีสำหรับเทคนิค FISH และศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

**สารเคมีสำหรับเทคนิค FISH มีดังนี้**

| Reagent | Grade | Company |
|---|---|---|
| Ethylenedinitrolo tetraacetic acid-Disodium salt dehydrate | Analytical | Merck |
| Formamide | Analytical | Unilab |
| Sodium chloride | Analytical | Merck |
| Sodium dodecyl sulfate | Biotechnology | Amresco |
| Tris HCl | Biotechnology | Amresco |

**สารเคมีสำหรับศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ มีดังนี้**

| Reagent | Grade | Company |
|---|---|---|
| Absolute ethanol | Analytical | Merck |
| Formalin | Analytical | วิทยาศรม |
| Xylene | Analytical | Merck |
| Ethyl alcohol | Analytical | Merck |
| Paraplast plus tissue embedding medium | Analytical | Oxford Labware |

### 1.4 โพรบสายสั้นๆ (Oligonucleotide probes)

EUB338 probe (5′-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3′) ติดฉลากด้วย fluorescein

Lab158 probe (5′-GGTATTAGCA(T/C)CTGTTTCCA-3′) ติดฉลากด้วย Cy3

GV probe (5′-AGGCCACAACCTCCAAGTAG-3′) ติดฉลากด้วย Cy3

โพรบทั้งหมดสังเคราะห์จากบริษัท Thermo Electron GmbH ประเทศเยอรมนี

**1.5 อาหารกุ้งขาว**

สูตรอาหารควบคุม (Control) ซึ่งเป็นสูตรเดียวกันกับที่ใช้ในงานวิจัยของศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** วัสดุอาหารที่ใช้สำหรับเตรียมอาหารกุ้งขาว

**Table 3** Compositions of shrimp feed

| Raw material | % in diet |
|---|---|
| Fish meal | 28.0 |
| Squid meal | 16.9 |
| Wheat flour | 20.0 |
| Rice flour | 10.1 |
| Soybean meal | 10.0 |
| Wheat gluten | 6.0 |
| Lecithin | 2.0 |
| Fish oil | 2.0 |
| Vitamin-mix | 0.5 |
| Mineral mixture | 2.0 |
| Vitamin C | 0.1 |
| Vitamin E | 0.08 |
| Choline chloride | 0.3 |
| Cholesterol | 0.5 |
| Zeolite | 1.5 |
| BHT | 0.02 |

**1.6 กุ้งขาว**

กุ้งขาวขนาด 5-10 กรัม ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มเกษตรกร จังหวัดปัตตานี และฟาร์มในเครือบริษัท เจริญโภคภัณฑ์ จำกัด อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา

## 2. อุปกรณ์

**2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งทดลอง**

2.1.1 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ, สายยาง และหัวทราย

2.1.2 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ประกอบด้วย สายยาง และเครื่องปั้มน้ำ ชนิดจุ่ม (submersible pump)

2.1.3 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้งทดลอง ได้แก่ ถังพลาสติก และสวิง

2.1.4 อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง, ความเค็ม, อัลคาไลน์ คือ ขวดรูปชมพู่, บีกเกอร์, ปิเปต, ลูกยาง และขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

**2.2 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ**

2.2.1 อุปกรณ์สำหรับดองรักษาสภาพเนื้อเยื่อกุ้งคือ เข็มขนาด 23G ยาว 1 นิ้ว, กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร, ขวดพลาสติกทนกรด, กรรไกร และมีดผ่าตัด

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อคือ กล่องใส่เนื้อเยื่อ (cassette), เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) และชุดเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

2.2.3 อุปกรณ์สำหรับตัดแต่งเนื้อเยื่อคือ ใบมีดผ่าตัด

2.2.4 อุปกรณ์สำหรับตัดเนื้อเยื่อคือ ไมโครโตม (sliding microtome), ใบมีดตัด, เนื้อเยื่อ, สไลด์แก้ว และอ่างน้ำอุ่น

**2.3 อุปกรณ์สำหรับเทคนิค FISH**

2.3.1 อุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิในการ Hybridized คือ เครื่อง Hybridization Oven (รุ่น Hybridizer HB-1D ยี่ห้อ TECHNE)

2.3.2 อุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิในการล้างโพรบ (probe) ด้วย washing buffer คือ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2.3.4 อุปกรณ์สำหรับตรวจผลและบันทึกภาพคือ กล้องอิพิฟลูออเรสเซนซ์ (epifluorescence microscope) (Olympus, BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD (Olympus, DP50) และกล้องคอนโฟคอล เลเซอร์ สแกนนิง (confocal laser scanning microscope) (Olympus, FV300)

**2.4 อุปกรณ์อื่นๆ**

2.4.1 อุปกรณ์สำหรับชั่งวัดน้ำหนักคือ เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง และ เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP3100S)

2.4.2 อุปกรณ์สำหรับวัดค่าดูดกลืนแสงคือ สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu, UV-1201)

2.4.3 อุปกรณ์สำหรับจัดเก็บสารละลาย, สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ และสายพันธุ์จุลินทรีย์ คือ ขวดแก้วทนกรด-ด่าง ขนาดต่างๆ และตู้แช่อุณหภูมิต่ำ (-70 องศาเซลเซียส) (Science Temp, USA)

2.4.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมวัสดุ, สารเคมี และอุปกรณ์ปลอดเชื้อคือ หม้อนึ่งความดัน (Tomy Seiko, Co., SS-325), ตู้ปลอดเชื้อ Laminar flow (Dryer Mark II, Clean) และตู้อบฆ่าเชื้อ (Sanyo, Program Oven)

## 3. วิธีการดำเนินการวิจัยและวิธีวิเคราะห์

สำหรับวัตถุประสงค์ขั้นแรกทำการศึกษาวิธีการเตรียมลำไส้ของกุ้งขาวจากการเปรียบเทียบการใช้น้ำยารักษาสภาพ 3 ชนิดคือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์, น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative; 33% of 95% ethanol, 22% of 100% formalin and 11.5% glacial acetic acid in distilled water) (Humason, 1972) และน้ำยา RNA friendly fixative (40.7% of 95% ethanol, 34.9% of 100% formalin and 2.2% $NH_4OH$ in distilled water) (Hasson *et al.*, 1997) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

### 3.1 การใช้เทคนิค Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) เพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*)

#### 3.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

กุ้งขาวสำหรับการทดลองนำมาจากฟาร์มเกษตรกร จังหวัดปัตตานี น้ำหนักเฉลี่ย 9.29 ± 0.42 กรัม จำนวน 60 ตัว เป็นกุ้งปกติไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง ตรวจโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อ และไวรัส Taura syndrome virus (TSV) ตรวจโดยวิธีทางชีวโมเลกุล (RT-PCR) นำกุ้งขาวมาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 5 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ระดับความเค็มของน้ำ 15 ส่วนในพันส่วน และให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

**3.1.2 การเตรียมตัวอย่างลำไส้บด**

เตรียมตัวอย่างกุ้งขาวโดยใช้น้ำยารักษาสภาพ 3 ชุด คือ ชุดที่ 1 กุ้งขาวจำนวน 20 ตัว รักษาสภาพ ในน้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเก็บในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ชุดที่ 2 กุ้งขาวจำนวน 20 ตัว รักษาสภาพในน้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ในการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (Humason, 1972) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายไปเก็บในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และชุดที่ 3 กุ้งขาวจำนวน 20 ตัว รักษาสภาพ ในน้ำยา RNA friendly fixative (Hasson *et al.*, 1997) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนน้ำยารักษาสภาพ เป็นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละชุดแยกเก็บรักษาตัวอย่างกุ้งขาวจำนวน 10 ตัว ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และจำนวน 10 ตัว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างกุ้งขาวจำนวน 5 ตัว จากแต่ละชุดสภาพการเก็บรักษามาเลาะเฉพาะส่วนลำไส้ นำมาบดให้ละเอียดด้วยวิธีการปลอดเชื้อโดยใช้โกร่งขนาดเล็ก เกลี่ยตัวอย่างลำไส้กุ้งขาวบดลงบนสไลด์ที่เคลือบเจลลาติน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งให้แห้ง นำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydrate) ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 1 ครั้งๆ ละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH

**3.1.3 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ**

เตรียมตัวอย่างกุ้งขาวจำนวน 5 ตัว จากแต่ละชุดที่เก็บรักษาในน้ำยารักษาสภาพต่างๆ คือ น้ำยาฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์, น้ำยาเดวิดสัน (Davidson's fixative) และน้ำยา RNA friendly fixative ทั้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเลาะเฉพาะส่วนลำไส้ออกมา แล้วนำไปดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยนำตัวอย่างลำไส้ใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ (cassette) แล้วแช่ในเอทานอลเข้มข้น 70, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 1 ครั้งๆ ละ 3 นาที ตามลำดับ แช่ในไซลีน (xylene) 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที และ พาราพลาสท์ (paraplast) 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ฝังเนื้อเยื่อ (embed) ด้วยพาราพลาสท์ โดยใส่ใน embedding glasses แล้วนำไปวางไว้บนเครื่องให้ความเย็น (cooling) ให้พาราพลาสท์แข็งตัว นำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตมแบบ rotary microtome ให้ได้ความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน นำไปลอยในอ่างน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ใช้แผ่นสไลด์ตักตัวอย่างที่ลอยอยู่ในน้ำกลั่นผสมเจลาตินที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ขึ้นมา นำไปอบที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน (ดัดแปลงจาก Loy *et al.*, 1996) นำแผ่นสไลด์ตัวอย่างผ่านขั้นตอนการนำพาราพลาสท์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaplast) โดยการแช่ในไซลีน 2 ครั้งๆ ละ 3 นาที ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 30 วินาที และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา

3 นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นนำแผ่นสไลด์ที่ผ่านขั้นตอนการนำพาราพลาสท์ออกจากเนื้อเยื่อ (deparaplast) ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค FISH

**3.1.4 เทคนิค FISH**

ทำการ hybridization ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Amann (1995) โดยบ่มตัวอย่างกับโพรบ EUB338 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5′-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3′ ที่จำเพาะกับแบคทีเรียทุกชนิด (domain bacteria) (Amann *et al*., 1990) ติดฉลากโพรบด้วยสารเรืองแสงสีเขียว (fluorescein; excitation wavelength = 492 nm, emission wavelength = 528 nm) (Moter and Gobel, 2000) โดยโพรบมีความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใน hybridization buffer (NaCl 0.9 M, Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01%, Formamide 20%) (ตารางภาคผนวก ก ที่ 1) นำตัวอย่างกับโพรบบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (TECHNE, Hybridizer HB-1D) ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ในสภาพที่เต็มไปด้วยไอของ hybridization buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย washing buffer (Tris/HCl 20 mM, SDS 0.01%, NaCl 0.225 M) (ตารางภาคผนวก ก ที่ 2) 1 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยดด้วย Anti-fading solution (*p*-phenylenediamine 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายผสมของ $NaCO_3$ กับ glycerol) ลงบนสไลด์ เพื่อชะลอการจางหายของสารเรืองแสง แล้วจึงปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ สำหรับตัวอย่างลำไส้บดนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ Epifluorescence (Olympus, BX51) และถ่ายภาพด้วยกล้อง Cooled CCD (Olympus, DP50) สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ที่เคลือบน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) บริเวณขอบสไลด์ก่อนนำตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล เลเซอร์ (Olympus, FV300)

## 3.2 การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรีย

โดยทำการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ก่อโรคแบคทีเรียในกุ้งขาวคือ *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* และยับยั้งการเจริญของ *V. harveyi* เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) เพื่อนำไปเลี้ยงกุ้งขาวต่อไป

**3.2.1 การเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp. และ *Bacillus* sp**.

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกมีจำนวน 8 สายพันธุ์คือ *L. acidophilus* TISTR 1034, *L. brevis* TISTR 855, *L. casei* TISTR 1304, *L. plantarum* TISTR 050, *Bacillus*

*amyloliquefacien* TISTR 1045, *B. subtilis* TISTR 008, *B. coagulan* TISTR 1456 และ *B. licheniformis* ซึ่งจุลินทรีย์ *Lactobacillus* sp. เลี้ยงในอาหาร MRS agar เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อโดยนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน สำหรับ *Bacillus* sp. เลี้ยงในอาหาร NA และ TSA (Merck) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อใหม่ ทุก 1 เดือน

**3.2.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ**

เตรียมเชื้อเริ่มต้น *Lactobacillus* sp. โดยการนำเชื้อแต่ละชนิดที่เก็บไว้มาถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS borth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นที่เกิดขึ้น และทดสอบยืนยันผลโดยการนำไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เตรียมเชื้อเริ่มต้น *Bacillus* sp. โดยการนำเชื้อแต่ละชนิดที่เก็บไว้มาถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB และ TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่นที่เกิดขึ้น และทดสอบยืนยันผลโดยการนำไปหยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ดัดแปลงจาก Cheng and Chen, 1999)

**3.2.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Vibrio haveyi* โดยวิธีการซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion)**

ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้วิธีการซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Schillinger และ Lucke (1989) ซึ่งเตรียมเชื้อ

เริ่มต้น (starter culture) โดยการนำเชื้อ (stock culture) ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ดังนี้ *Bacillus amyloliquefacien* TISTR 1045, *B. subtilis* TISTR 008, *B. coagulan* TISTR 1456 และ *B. licheniformis* ปริมาณเชื้อละ 5 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารเหลว TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ *L. acidophilus* TISTR 1034, *L. brevis* TISTR 855, *L. casei* TISTR 1304 และ *L. plantarum* TISTR 050 ปริมาณเชื้อละ 5 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเชื้อ *V. harveyi* เลี้ยงบนอาหาร TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เมื่ออุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส เติมเชื้อ *V. harveyi* โดยปรับความเข้มข้นที่ $OD_{610}$= 0.1 ลงไป 300 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อประมาณ $10^3$ CFU/ml เขย่าให้เชื้อกระจายสม่ำเสมอ แล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว จากนั้นใช้ปลายของ pasture pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วเจาะวุ้นออกให้เป็นหลุมให้เส้นผ่าศูนย์กลางกว้าง 0.6 เซนติเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจานอาหาร จึงเติมเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดลงไป 50 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) บนจานอาหารแต่ละชนิด จึงเลือกจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) กว้างที่สุดมาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคต่อไปและนำไปคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้ง (ภาคผนวก ข)

**3.2.4 วิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Co-culture)**

ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *L. plantarum* ในการยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* โดยใช้วิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Co-culture) ในน้ำทะเล ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากสุภฎา คีรีรัฐนิคม และคณะ (2543) ซึ่งเตรียมน้ำทะเลความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมอาหารกุ้งสำเร็จรูป (สารอินทรีย์) ที่มีความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดคือ ชุดควบคุมที่มีปริมาณเชื้อ *V. harveyi* เริ่มต้น $10^3$ CFU/ml ไม่เติมเชื้อโปรไบโอติก และชุดทดลองที่มีปริมาณเชื้อ *V. harveyi* เริ่มต้น $10^3$ CFU/ml เติมเชื้อโปรไบโอติก (*L. plantarum*) ระดับความเข้มข้น $10^2$, $10^3$ และ $10^4$ CFU/ml ตามลำดับ แต่ละชุดการทดลองแบ่งเป็น 2 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างจากแต่ละฟลาสก์ทุก 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน โดยการสุ่มตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร จากแต่ละฟลาสก์ เจือจางในน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 450

ไมโครลิตร จนมีระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1000 นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับนับปริมาณเชื้อ *L. plantarum* และอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับนับปริมาณเชื้อ *V. harveyi* และบันทึกผลเป็นเวลา 10 วัน

หลังจากทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกแล้วจึงเลือกเชื้อที่ดีที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. harveyi* ทั้งวิธีการทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเค็มในระดับต่างๆ วิธีการซึมผ่านวุ้น (agar well diffusion) และวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกัน (Co-culture) แล้วจึงนำมาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งขาวต่อไป

### 3.3 การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในกุ้งขาวโดยการนำเซลล์สดผสมกับอาหารกุ้งขาว

อาหารกุ้งเตรียมจากการชั่งวัสดุอาหารตามสูตรในตารางที่ 4 ผสมและอัดเม็ดด้วย Hobart mixer และ grinder จากนั้นจึงหักเป็นเม็ด (มะลิ บุณยรัตนผลิน และคณะ, 2543) นำเซลล์สดของ *L. plantarum* ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ $10^3$, $10^6$ และ $10^9$ CFU/g ผสมกับอาหารกุ้งโดยการพ่น (spray) ลงบนเม็ดอาหารและคลุกเคล้าให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบปริมาณของเชื้อ *L. plantarum* จากอาหารกุ้งแต่ละชุดการทดลอง เพื่อควบคุมปริมาณเชื้อในอาหารทดลองให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่กำหนด โดยบดอาหารกุ้งให้ละเอียดด้วยโกร่งที่ปราศจากเชื้อ เจือจางอาหารกุ้งด้วยน้ำเกลือ 1.5 เปอร์เซ็นต์ จนมีระดับความเจือจาง 1:10 ถึง 1:1,000,000 จึงนำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อาหารที่ผสมโปรไบโอติกจะให้กุ้งขาวกินเป็นเวลา 3 วัน และให้อาหารปกติ 4 วันสลับกัน เลี้ยงกุ้งขาวน้ำหนัก 9.21±0.51 กรัม เป็นเวลา 1 เดือน

จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างกุ้งขาวหลังจากหยุดให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 เป็นเวลา 4 วัน เพื่อติดตามโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวโดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) และชั่วโมงที่ 72 ทำการนับจำนวนด้วยวิธี plate count แล้วเปรียบเทียบกับกุ้งขาวในชุดควบคุมที่ให้อาหารเม็ดธรรมดาโดยแบ่งเป็นชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดควบคุม กุ้งขาวให้อาหารปกติ

ชุดทดลองที่ 2 กุ้งขาวให้อาหารผสม *L. plantarum* $10^3$ CFU/g

ชุดทดลองที่ 3 กุ้งขาวให้อาหารผสม *L. plantarum* $10^6$ CFU/g

ชุดทดลองที่ 4 กุ้งขาวให้อาหารผสม *L. plantarum* $10^9$ CFU/g

ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากให้อาหารมื้อสุดท้ายในวันที่ 3 โดย เริ่มเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48 และ 72 ตามลำดับ ในฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และติดตาม *L. plantarum* โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) และคำนวณปริมาณแบคทีเรียตามวิธีการของ Davenport *et al*., (2000) และ Oliveira *et al*., (2003) (ภาคผนวก ข)

**3.3.1 การทดสอบความต้านทานโรค (Disease resistance)**

ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร TSA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเตรียมน้ำทะเล 50 ลิตร ในตู้ทดลอง โดยมีความเข้มข้นของเชื้อ *V. harveyi* ประมาณ $10^4$ CFU/ml ในตู้ทดลองของแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นจึงนำกุ้งแต่ละชุดการทดลองจำนวน 10 ตัว ไปแช่ในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ดังกล่าว เป็นเวลา 14 วัน สังเกตและบันทึกอัตราการตาย

**ตารางที่ 4** ส่วนประกอบและปริมาณวัตถุดิบในอาหารที่ใช้ในการทดลอง

**Table 4** Compositions of test diets in this study

| Raw material | % in diets | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **3** | **4** |
| Fish meal | 28.0 | 28.0 | 28.0 | 28.0 |
| Squid meal | 16.9 | 16.9 | 16.9 | 16.9 |
| Wheat flour | 20.0 | 20.0 | 20.0 | 20.0 |
| Rice flour | 10.1 | 10.1 | 10.1 | 10.1 |
| Soybean meal | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Wheat gluten | 6.0 | 6.0 | 6.0 | 6.0 |
| Lecithin | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Fish oil | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Vitamin-mix[a] | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Mineral mixture[b] | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| Vitamin C | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| Vitamin E | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| Choline chloride | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Cholesterol | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| Zeolite | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| BHT | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| *L. plantarum* (CFU/g) | - | $1.26 \times 10^3$ | $1.89 \times 10^6$ | $2.03 \times 10^9$ |

[a] Vitamin mixture (mg/kg diet) : thiamin 22.5; riboflavin 20; nicotinic acid 36.7; Ca pantothenate 24; inositol 98; biotin 0.5; folic acid 1.68; vitamin $B_{12}$ 0.005; menadione 13.28; vitamin A 1150 IU; vitamin $D_3$ 230 IU; BHT 1; PABA 20.

[b] mineral mixture (g/kg diet) $KH_2PO_4$ 1; $NaH_2PO_4$ 1.5; KCl 0.5.